



TITLE:

液中原子間力顕微鏡を用いた生体分子のナノスケール構造計測およびその表面相互作用評価( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

木南, 裕陽

---

CITATION:

木南, 裕陽. 液中原子間力顕微鏡を用いた生体分子のナノスケール構造計測およびその表面相互作用評価. 京都大学, 2019, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21771>

RIGHT:

許諾条件により本文は2019-07-23に公開

京都大学	博士（工学）	氏名	木南 裕陽
論文題目	液中原子間力顕微鏡を用いた生体分子の ナノスケール構造計測およびその表面相互作用評価		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>微細加工技術であるナノテクノロジーと生体分子を扱うバイオテクノロジーを融合したナノバイオテクノロジーを用いることで、生体分子を利用したナノスケールのデバイス開発や創薬が盛んに行われている。しかし、液中環境下における生体分子の物性や機能発現メカニズムに関しては、その評価手法の少なさから十分な情報は得られていない。原子間力顕微鏡（AFM）は液中環境下においてナノスケールの空間分解能を有する手法の一つであり、生体分子の構造観察に広く用いられている。一方で、AFMを用いた生体分子の物性やその相互作用評価に関する研究は十分に行われていない。</p> <p>本論文は、AFMを用いることで液中環境下における生体分子のナノスケール構造計測およびその表面相互作用評価を行った結果をまとめたものであり、全 6 章からなっている。</p> <p>第 1 章は序論であり、生体分子の基本的な構造、ナノバイオテクノロジーの具体的な利用例および液中環境において動作する AFM の現状を記述示している。特に、AFMを用いた生体分子の構造観察に関する研究の現状が詳細にまとめられている。これを踏まえて、AFMを用いたナノスケールでの生体分子の構造、物性および機能評価を行うことを本論文の目的とすることを述べている。</p> <p>第 2 章では、本論文で評価手法として用いる AFM の詳細な動作原理、および従来の AFM 法について述べている。まず AFM 探針-試料間にはたらく相互作用力について述べ、続いて従来の AFM 法がまとめて記述されている。さらに、周波数変調 AFM (FM-AFM) の動作原理や装置構成、固液界面構造計測のための測定手法などを詳細に説明している。特に、FM-AFM による生体分子の高分解能イメージングに向けた観察条件の検討は、第 3 章以降を議論する上で非常に重要であると考えられ、FM-AFM を用いた生体分子高分解能観察における指針となりうる内容となっている。</p> <p>第 3 章では、3 次元フォースマッピング法による DNA の表面電荷密度計測、および DNA 上で構造化した水分子（水和構造）の可視化について述べている。まず、DNA が通常 B 型と呼ばれる右巻きの 2 重らせん構造（B-DNA）をとることについて述べ、特殊な条件下においては Z 型と呼ばれる左巻きの 2 重らせん構造（Z-DNA）へとコンフォメーションを変化させることについて説明している。その上で、それぞれの DNA を高分解能観察し、高さやらせん周期の違いについて議論し、さらには主溝、副溝と呼ばれる詳細ならせん構造を両方のコンフォメーションにおいて明瞭に可視化したことを述べている。また、3 次元フォースマッピング法を用いた表面電荷密度計測を行い、Z-DNA の表面電荷密度が B-DNA の表面電荷密度に比べ小さいことを述べており、Z-DNA の機能解明に向けた可能性が記されている。さらに、2 種類の 3 次元フォースマッピング法を組み合わせることによりプラスミド DNA (B-DNA) の水和構造計測を行った結果について説明している。それぞれの手法における長所を活かし、測定結果を比較することで明瞭な 3 次元水和構造の可視化に成功したことが記述されており、リン酸基上において水分子が構造化することが示されている。</p> <p>前章では単一分子（DNA）の構造計測および物性評価の結果を示したが、第 4 章では生体分子間の相互作用として抗原-抗体反応を取り上げ、抗体分子自己組織化（6 量</p>			

京都大学	博士（工学）	氏名	木南 裕陽
<p>体化、2次元結晶化）の一般性および自己組織化した抗体分子の抗原結合能評価を行った結果について述べている。最初に、自己組織化が確認されている抗体分子を含め、5種類の異なる抗体分子の高分解能観察を行い、自己組織化の有無について評価した結果を述べている。その後、6量体化に関しては比較的一般的な現象であるのに対し、2次元結晶化に関しては特定の抗体分子のみで生じる現象であり、自己組織化と機能の関係について言及している。次に、自己組織化した抗体分子に対して抗原性分子を滴下し、FM-AFM 観察した結果について述べている。抗原性分子の濃度や吸着時間を変化させて吸着量の評価を行い、抗原吸着量の時間変化と飽和量から抗原抗体反応の重要なパラメータである結合速度定数を求めた結果について説明している。本論文の条件下においては、抗体分子が基板上に固定されてことに起因して、結合速度定数が先行研究などに比べて1桁小さいことを説明している。</p> <p>第5章では、Annexin V と呼ばれるタンパク質を対象に、その2次元結晶化の高分解能観察結果やその応用例について述べている。まず、Annexin V 2次元結晶を脂質2重膜上において作製し、FM-AFM を用いて高分解能観察を行い、サブ分子スケールでの構造観察、さらにはアミノ酸ループの観察に成功したことについて説明している。その後、pH や吸着時間、脂質2重膜の組成を変更することにより Annexin V 2次元結晶の結晶形成を制御した結果について言及し、Annexin V 2次元結晶の空孔密度制御に成功したことや結晶系の異なる Annexin V 2次元結晶を新たに発見したことについて述べている。さらに、Annexin V 2次元結晶が多くの空孔を有する条件下において streptavidin と呼ばれるタンパク質を滴下し、空孔内に配置することで、streptavidin ナノアレイを作製したことについて述べている。streptavidin は biotin と呼ばれる分子と特異的に結合することが知られており、実際に biotin 化されたタンパク質を streptavidin 上に滴下することで、streptavidin ナノアレイが特異結合能を保持していることを明らかにした。また、結合サイトの密度に関しても議論を行っており、バイオセンサなどのバイオデバイスへの展開についても言及している。</p> <p>第6章は結論と今後の展望であり、本論文で得られた成果についてまとめるとともに今後の展開について述べられている。</p>			

## (論文審査の結果の要旨)

本論文は、周波数変調原子間力顕微鏡 (FM-AFM) を用いて生体分子の分子スケールでの固液界面構造計測、生体分子間相互作用の評価、さらにはその応用に関する研究を行った結果をまとめたものであり、得られた主な成果は以下の通りである。

1. DNA が液中環境下において形成する右巻きの B 型 DNA (B-DNA) とは異なる左巻きの Z 型 DNA (Z-DNA) を作製し、主溝と副溝を明瞭に可視化することに成功した。また、表面電荷密度計測を行うことで Z-DNA の表面電荷密度が  $-116 \text{ mC/m}^2$  であることを明らかにした。
2. プラスミド DNA (B-DNA) 上において 3 次元水和構造計測を行うことで、DNA 上における水分子密度を反映した周波数シフト分布の計測に成功した。
3. 複数の種類の IgG 抗体分子を FM-AFM 観察することにより、6 量体化は比較的一般的な現象であるが、2 次元結晶化は特定の抗体分子でのみ生じることを明らかにした。また、IgG 抗体分子 2 次元結晶と抗原性分子を相互作用させることにより、その反応の結合速度定数を求めることに成功した。
4. Annexin V 2 次元結晶を作製し、FM-AFM 観察を行うことで、サブ分子スケールでの構造観察に成功した。また、Annexin V 2 次元結晶の結晶形成を制御可能であることを明らかにし、streptavidin を Annexin V 2 次元結晶の空孔内に配置することで streptavidin ナノアレイの作製に成功した。biotin 化タンパク質を streptavidin ナノアレイ上に滴下することで、streptavidin が biotin 結合能を保持していることを確認した。

本論文は、 以上のようにナノバイオデバイス開発において必要不可欠な生体分子のナノスケール構造観察およびその表面相互作用評価を行っており、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 31 年 1 月 23 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。